

論文の内容の要旨

論文題目 メチル化頻度プロファイリング法「MSD-AFLP 法」の開発

氏名 相場俊樹

第1章 序論

胎生期の成育環境がその後の成人期における疾患発症のリスクにつながるという学説が、健康影響を考える上で国際的に注目されている。かつてイギリスの衛生学者 David Barker は疫学的研究から「胎生期に低栄養状態であることが成人期における心血管障害のリスク因子である」と述べた。この仮説はさらに拡張され、胎生期・新生児期の栄養状態や化学物質曝露などの環境要因が、生活習慣病のみならずその他の疾患の感受性を決める重要なファクターとなりうるという

「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)」という概念となった。その発生機序は未だ解明されてはいないが、胎児への環境因子曝露が DNA メチル化などのエピゲノムに変化を与え、それが生後まで残ることで、各種の遺伝子の発現調節機構が変化するためだとされている。したがって、衛生学・環境毒性学的分野においてエピゲノム変化を検出することは、今後も広範に要求されるものと考えられる。

第2章 Methylated Site Display –AFLP (MSD-AFLP) 法の開発

環境汚染化学物質などの胎生期曝露によって引き起こされるエピゲノム変化は、個体の後天的表現型にとって重要であるが、変動が微弱で個体間のバラツキも大きいと予想される。したがって、メチル化の小さな変動を検出できるような精度が高く、多検体を同時処理できる比較的廉価なゲノムワイドな手法が必要とされている。

一般的に網羅的 DNA メチル化解析において、Restriction landmark genomic scanning (RLGS) や *Hpa* II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) 法^{1, 2}、Methylated DNA immunoprecipitation (Medip) 法あるいは Whole genome bisulfite sequence (WGBS) 法などが使用されてきた。しかし、いずれの手法もメチル化の有無の判断には有効だが、サンプル間で微弱に変動する特定の CpG メチル化頻度 (Methylation Frequency: MF) を定量するには、精度面において改良の余地がある。また、これらメチル化感受性制限酵素を用いた網羅解析法の多くは、メチル化 CpG 量の試料間の変動を非メチル化 CpG 量から計測しており、特に高メチル化状態にあるメチル化 CpG の微細な変動を見逃している可能性が否めない。そこで本研究では、メチル化感受性制限酵素を用

い、高い処理能力と高精度・高感度を両立させ、メチル化部位のみを直接提示する Methylated site display (MSD) 法を開発した。この MSD 法に、Amplified fragment length polymorphism (AFLP) を組み合わせ、メチル化部位のゲノムワイドなプロファイルを取得する測定技術体系 (MSD-AFLP 法) を設計した。

DNA のメチル化レベルは遺伝子の転写レベルに関与し、組織特異的遺伝子発現調節のために組織特有の遺伝子のメチル化パターン Tissue-specific differentially methylated region (tDMR) があることが知られている。本研究では、考案した MSD-AFLP 法の精度確認の目的、ならびに AFLP チャートデータから MF 値を直接換算する際の補正方法確立のために 3 種類の組織 (海馬、腎臓、肝臓) を解析した。その結果、16 種の選択プライマーセットで検出された 2,449 CpG サイトのうち、tDMR と考えられる多数のメチル化 CpG が検出された (Fig. 1)。

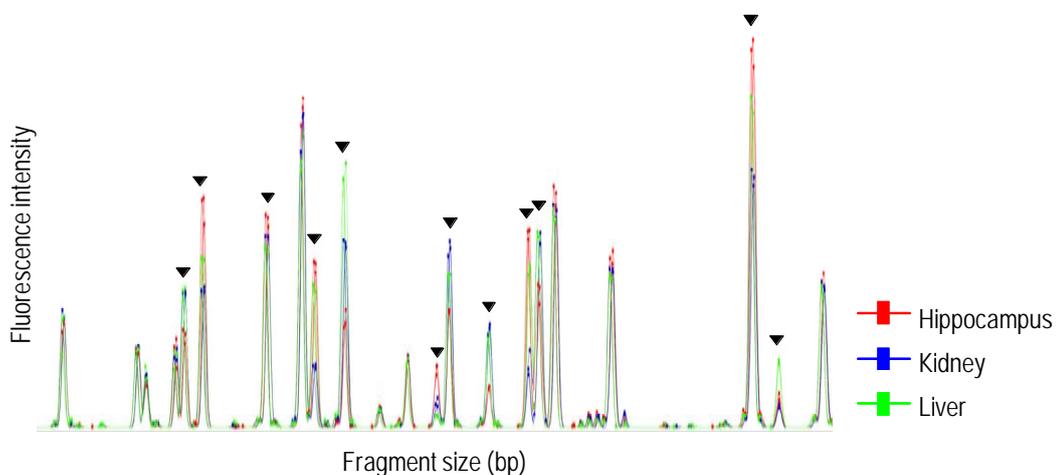


Fig. 1. マウス 3 個体各 3 組織の DNA メチル化を比較した MSD-AFLP のピークチャート
縦軸は蛍光強度、横軸はフラグメントの長さを表している。それぞれのピークは、ゲノム DNA サンプル中でメチル化されていたサイトを含むフラグメントを、その高さはフラグメントの量を示しており、矢頭は、3 つの組織でメチル化頻度に差があったピークを示している。

また、MSD-AFLP 法の結果は真の MF 値を測定できる現在最も有効な MSRE-PCR 法で測定した時の組織間の変化率に極めて近いことが判った。さらに、MSRE-PCR の平均変動係数が 6.2% であるのに対し、MSD-AFLP の平均変動係数は 4.8% であり、その測定のばらつきの程度は MSRE-PCR 法とほぼ同等に小さいことが判った。そして 3 組織間 2,449 CpG の解析において、MF 値の比が 1.1 倍以内かつ MF 値の差が 5% 以下を示す 24 個の有意な違いを検出できただけでなく、MF 値の差において 0.29% という微細変化も検出でき、予想通りの精度の高い網羅解析法であることが判った (Fig. 2)。

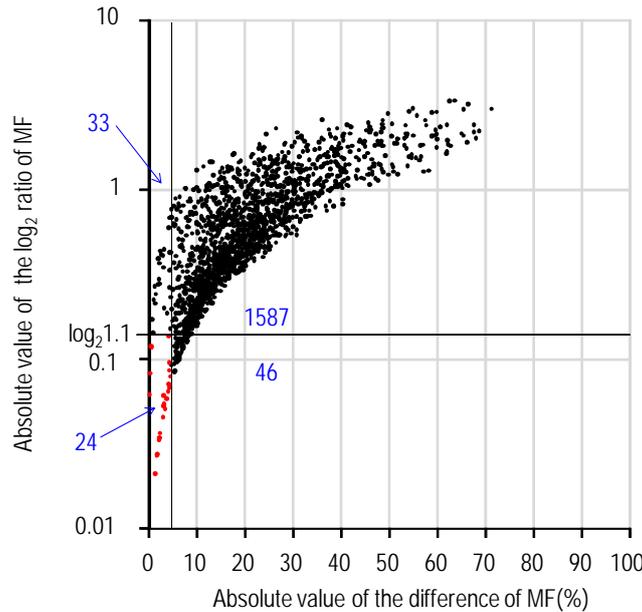


Fig. 2. MSD-AFLPの変動検出感度

Tukey-testで有意差のあった組織間のメチル化頻度の比とメチル化頻度の差をプロットしたものである。縦軸はメチル化頻度の比を、横軸はメチル化頻度の差を示している。左下の四角は、他の網羅解析で検出困難なメチル化頻度の比が1.1倍以内かつメチル化頻度の差が5%の範囲のものを示している。青色の数字は各エリア内のスポット数を表している。

またゲノム塩基配列情報の整備が良好なヒトおよびマウスについて、MSD-AFLP法により得られるメチル化 CpG のゲノム塩基配列上の位置を予測あるいは確認するシステムを開発した。実際このシステムを用い、3種類の組織でメチル化頻度が同じであったピーク3個、差があったピーク8個の計11個に関して、それぞれのピークに対する CpG サイトの染色体上の位置を検索するとともに、実際にフラグメントをゲル電気泳動で分離分取して塩基配列を決定したところ、11ピークのうち8ピークは検索結果と一致した。また、MSD-AFLP法は1回の解析で全 CpG (約 20,000,000) の約 0.3% (55,181-CpG) をカバーできるため、次世代シーケンサーを利用した各種の次世代メチル化解析に比べ、費用対効果の点で優れていると考えられる。

これらの結果から、本研究で開発した (MSD-AFLP法) は、低コストで高精度かつ高感度に未知の CpG メチル化の変動を網羅的に解析できる手法であることがわかった。特に複数のサンプルを比較的簡単に処理できるため、環境因子による微細なエピジェネティック変化を検出する有用な方法として衛生学・環境毒性学的研究に適していると考えられる。また、次世代シーケンサーを用いた解析が困難である大量の臨床サンプルを用いたがん幹細胞の新規エピジェネティックマーカーの探索などにも将来的に貢献できると考えられる。

第3章 MSD-AFLP法を用いた胎生期 BPA 曝露マウスの CpG メチル化変動解析

この手法を環境汚染化学物質としてエピゲノム、特にメチル化 CpG を変化させることがすでに報告されている代表的な化学物質であるビスフェノール A (BPA) によるエピゲノム変化の解析に

適用した。妊娠マウスに BPA を連日経口投与し、その雄産仔の大脳海馬の MSD-AFLP 解析を行った。Vehicle 投与群 (n=6) と BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群 (n=6) で比較したところ、全選択的プライマーセットで検出された 43,840 個の CpG で BPA により統計学的に有意に変動したものは存在しなかった。BPA 以外にもビクロゾリンなどエピゲノム変化を誘導する化学物質が報告されているが、それらの化学物質によるエピジェネティック影響の真偽を検討する上で、本論文で開発した MSD-AFLP 法は有効となると考えられる。

1. Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Grealley JM. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 2006;16:1046-55.
2. Figueroa ME, Melnick A, Grealley JM. Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Methods Mol Biol* 2009;538:395-407.